

Année 1974

THÈSE

NO

35

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Georges FAHD

né le 3 juin 1943 à Pointe-à-Pitre (Guadeloupe)

Présentée et soutenue publiquement le

CRYOCONSERVATION DE LA CORNEE

Appréciation de la méthode
par la kératoplastie expérimentale
et par l'étude structurale et ultrastructurale

Président : M. Guy OFFRET, Professeur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Année 1974

THÈSE

NO

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Georges FAHD

né le 3 juin 1943 à Pointe-à-Pître (Guadeloupe)

Présentée et soutenue publiquement le

CRYOCONSERVATION DE LA CORNEE

Appréciation de la méthode
par la kératoplastie expérimentale
et par l'étude structurale et ultrastructurale

Président : M. Guy OFFRET, Professeur

THESE

DOCTORAT IN MÉDECINE

PAR

LE

DOCTEUR

LEONARDUS VAN DER WEGE



DE L'UNIVERSITÉ DE LEIDE

LE 10 JANVIER 1871

LEONARDUS VAN DER WEGE

A mes Parents,

A ma Femme

A ma Fille

A mes Frères, A mes Soeurs

A mes Beaux-Parents

Avec toute mon affection.

A Monsieur le Professeur Guy OFFRET

Professeur de Clinique ophtalmologique
à la Faculté de Médecine de Paris

Ophtalmologiste des Hôpitaux.

Il m'a fait l'honneur de présider cette thèse

Qu'il en soit très respectueusement remercié.

A Monsieur le Professeur Paul PAYRAU

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

Ophthalmologiste de la Fondation A. de Rothschild

C'est dans son service et dans son laboratoire
que j'ai pu perfectionner mes connaissances en
ophtalmologie et apprécier ses qualités humaines.

Je ne le remercierai jamais assez de son ensei-
gnement dont la richesse, la clarté et la précision
sont si précieuses.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma
profonde gratitude et de mon admiration.

A Monsieur le Docteur Pierre-Victor MORAX

Chez qui j'ai découvert l'ophtalmologie

Qu'il en soit respectueusement remercié.

Au Docteur Anne-Gabrielle GAJDOS-PREUSS

Ce travail lui appartient autant qu'à moi

Qu'elle soit vivement remerciée pour tous ses
conseils

A ceux qui m'ont aidé à faire ce travail

Monsieur le Professeur agrégé Yves POULIGUEN

Monsieur le Docteur Jean-Antoine BERNARD

Monsieur le Docteur Jean-Pierre FAURE

Madame Josette DOS SANTOS

Mademoiselle Odile TAILLEBOURG

Que soient également particulièrement remerciés pour leur
aide amicale

le Docteur Guy SCHILOVITZ
le Docteur Jean ROGER

Mes remerciements iront également

Au Centre de Documentation Chibret pour l'aide
qu'il m'a fournie

Aux Laboratoires Chibret et Bouchara pour les
médicaments fournis gracieusement.

INTRODUCTION

On sait depuis longtemps que la survie de l'endothélium est indispensable au maintien de la transparence d'un greffon cornéen.

Jusqu'à ces dernières années, aucune méthode de conservation de la cornée ne permettait avec des chances raisonnables de succès, une kératoplastie transfixiante après un délai de quelques jours.

La congélation, méthode de conservation des cornées entières fait l'objet de nombreuses recherches actuellement (4, 9, 18, 22, 24, 30).

Dans notre travail, dont le but est de préciser les conditions dans lesquelles devrait se faire au mieux la congélation pour maintenir un endothélium viable, la méthode de base est celle décrite par Gajdos-Preuss (11).

Dans sa thèse, on peut déjà se faire une idée des facteurs susceptibles d'intervenir dans le pronostic de ces cornées cryo-conservées.

Ces facteurs ont été modifiés séparément et l'efficacité de ces modifications a été appréciée par deux méthodes de contrôle :

- la kératoplastie expérimentale
- l'étude structurale et ultrastructurale.

Parallèlement à ces recherches nous avons montré par l'étude de la chromatine sexuelle la persistance de l'endothélium du greffon quand celui-ci restait transparent.

I - MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL.

Il a été mis au point au cours des études précédentes dans le centre de recherches d'ophtalmologie de la Fondation, A. de Rothschild (groupe U. 86 de l'INSERM).

Décrit en détail par Gajdos-Preuss (11), il comprend :

- . un appareil de congélation
- . un container de stockage rempli d'azote liquide et où sont rangés dans des canisters, des boîtiers métalliques contenant les cornées.

B - METHODE.

C'est celle qui a été décrite par Gajdos-Preuss.

Nous y avons porté quelques modifications dont l'efficacité a été vérifiée par les deux méthodes de contrôle choisies.

Ces modifications ont porté sur tous les stades de la manipulation

- . au niveau du prélèvement
- . au niveau de l'incubation dans le liquide cryoprotecteur.
- . au niveau de la congélation
- . au niveau du dégel.

1 - Au niveau du prélèvement.

La manipulation d'une cornée quand elle est prélevée avec un anneau scléral est beaucoup plus facile que quand elle est prélevée au limbe. En effet cet anneau scléral confère une certaine rigidité à la cornée et l'empêche de se plier lors des opérations de manipulation, ce qui constitue une agression supplémentaire de l'endothélium.

Les études histologiques nous ont montré cependant que le prélèvement avec anneau scléral comportait un risque encore plus grand, celui de congeler une cornée sans son endothélium. Ceci, parce que l'endothélio-descemet est uni au corps ciliaire par un trabéculum assez étendu et il n'est pas rare que cette couche endothéliale reste unie au corps ciliaire quand on prélève la cornée avec de la sclère.

Les cornées ont donc été prélevées au limbe par incision au couteau complétée par des ciseaux de castroviejo.

2 - Au niveau de l'incubation.

Toutes les manipulations, qu'il s'agisse de préparation du liquide cryoprotecteur, du prélèvement de la cornée, de l'incubation proprement dite, ou de la mise en boîte de la cornée, se font en chambre stérile (U. V.).

En l'absence de ces précautions, nous avons eu un grand nombre d'échecs de kératoplasties par infection par germes banaux, et surtout, par champignons présents dans l'ambiance de tous les laboratoires.

Nous préparons le liquide d'incubation par avance, mais nous le conservons un maximum de 15 jours à $+4^{\circ}\text{C}$ car il constitue un excellent milieu d'incubation.

Ce liquide contient, dans un rapport de $2/3 - 1/3$, du sérum de lapin et du milieu de Eagle dilué. Ce rapport nous a paru le plus favorable pour limiter les variations de pression osmotique, génératrices de dégâts cellulaires lors de la congélation et du dégel.

A partir de ce liquide sont préparés des bains à concentrations croissantes de DMSO (Tableau I). Chaque cornée est trempée 5 minutes dans chacun des bains maintenus à $+4^{\circ}\text{C}$.

En ml	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 4
Milieu de Eagle dilué	13	12, 8	12, 5	12, 1
Sérum de lapin	26	25, 6	25	24, 5
DMSO pur pour chromatographie gazeux.	0, 8	1, 6	2, 4	3, 00

3 - Au niveau de la congélation.

Les cornées sont placées dans le boîtier métallique spécial avec 1/2 cc de liquide cryoprotecteur du dernier bain. C'est une précaution prise pour protéger l'endothélium du contact de l'azote liquide dans le container d'une part, et, d'autre part pour faciliter le prélèvement de la cornée du boîtier métallique au moment du dégel alors qu'elle est encore entourée du bloc de glace formé par le liquide cryoprotecteur.

Nous avons essayé différents types de courbe programme (cf. thèse Gajdos-Preuss pour détails) toujours contrôlés par l'enregistrement d'une cornée témoin.

Il faut signaler que pour une même courbe programme, on obtient des courbes enregistrées différentes. On peut penser que ces variations dépendent, entre autres, de la température ambiante, de la température de l'enceinte au début de la congélation et du nombre de cornées congelées.

C'est ainsi que pour une même courbe programme nous avons eu des résultats aussi variables que des temps respectifs de 3 minutes 30, 2 minutes ou 50 secondes pour la durée de la surfusion. Or, comme nous le verrons plus loin, ce sera surtout sur cette période que porteront les modifications à contrôler.

4 - Au niveau du dégel de la cornée.

Deux facteurs importants sont à signaler à ce temps de l'expérimentation :

- . la qualité du liquide de dégel
- . la rapidité de ce dégel en rapport évidemment avec la température du liquide.

a - Nous avons essayé deux types de liquide :

- . mélange sérum de lapin-milieu de Eagle dilué (dans les mêmes proportions que dans le liquide cryoprotecteur).
- . sérum de lapin isolé.

Ces 2 liquides étant toujours additionnés de quelques gouttes de chloramphénicol.

Il nous est apparu que le deuxième choix était le meilleur car des réactions inflammatoires importantes avec vascularisation intensive avaient été notées après les kératoplasties avec les cornées dégelées dans le premier type de liquide.

b - Nous n'avons pas trouvé de différences significatives dans les résultats de kératoplasties entre le dégel à température ambiante et le dégel avec le liquide à + 37° C.

Technique du dégel-rinçage des cornées cryoconservées.

- . le récipient cylindrique est retiré du container d'azote avec beaucoup de précautions. Il est toujours orienté vers le sol car il y a risque d'explosion et de projection du couvercle en plastique, dû au réchauffement brutal du récipient au contact de la température ambiante alors qu'il contient encore un peu d'azote liquide.
- . Après ouverture du récipient, 10 cc de sérum de lapin y sont versés et la cornée est ensuite rapidement enlevée avec une pince courbe sans mors. Elle est encore entourée à ce stade d'un petit bloc de glace et elle est placée dans un premier récipient avec du sérum de lapin où s'achèvera le dégel proprement dit.

La durée du dégel est d'environ une minute et le rinçage se prolonge ensuite 15 minutes en moyenne. Pour cela, nous laissons la cornée 5 minutes dans le premier récipient contenant du sérum de lapin puis, nous la mettons dans un deuxième récipient identique où elle séjournera jusqu'à la greffe elle-même.

Ce temps nous rapproche de Edelhausser (6) qui a montré qu'un rinçage de 10 minutes suffisait pour enlever 65 % du DMSO et que le reste du DMSO qui persistait dans la cornée était évacué par le renouvellement de l'humeur aqueuse.

Il est évident, que plus la cornée restera dans le liquide de dégel, plus elle sera oedématiée au moment de la greffe. Nous avons cependant constaté qu'il n'y avait aucun rapport entre l'épaisseur du greffon et le devenir de la greffe. Beaucoup de cornées très oedématiées au départ sont redevenues rapidement claires, et le sont restées ensuite. Il ne semble y avoir, donc, aucun inconvénient à laisser la cornée dans son liquide de dégel. Nous n'avons toutefois pas greffé des cornées ayant séjourné plus de 45 minutes dans le liquide de dégel.

5 - Contrôles.

Deux contrôles, clinique et histologique, nous ont permis d'apprécier ces différentes modifications.

a - Contrôle clinique :

α - Technique opératoire.

- Kératoplastie transfixiante chez le lapin selon la technique de SICAULT, PAYRAU, BERNARD. (35).

- Ce sont des lapins albinos dont le poids moyen se situe entre 1,5 et 2,5 kg, anesthésiés en intraveineuse lente par du nembutal à la dose de 28 mg/kg environ.

Il faut signaler la difficulté de l'anesthésie du lapin, car la dose anesthésique est très variable d'un animal à l'autre, et surtout très proche de la dose létale. Nous avons eu, dans un certain nombre de cas, affaire avec un problème technique particulier : l'agitation d'un lapin insuffisamment endormi, très traumatisante pour le greffon en cours d'être suturé. Il est parfois difficile d'apprécier le rôle de tels incidents mécaniques sur l'évolution ultérieure du greffon.

- Toutes nos trépanations ont été de 8 mm de diamètre. Dans les greffes de diamètre inférieur, la largeur de l'anneau limitant qui mesure jusqu'à 2 mm, laisse une surface centrale trop petite pour apprécier valablement la qualité du greffon, pendant la surveillance post-opératoire.

- Les sutures sont faites à la soie vierge 8.0. Elles sont constituées par 8 points séparés et un surjet passé au lieu d'un surjet simple. Nous insistons sur ce dernier point car la cicatrisation des cornées congelées nous a paru beaucoup plus longue que celle des cornées fraîches. Surtout avec la corticothérapie post-opératoire immédiate et prolongée. Le surjet passé réalise en effet un affrontement plus régulier des bords de la plaie opératoire.

- Lors des interventions sous microscope, il nous est apparu un fait curieux qui vaut d'être signalé :

. Le prélèvement du greffon de la cornée décongelée, se fait par trépanation par voie endothéliale, la cornée reposant sur son côté épithélial. Ce prélèvement nécessite une certaine pression sur le trépan et on s'aperçoit alors, au microscope, que le greffon est très aplati sur les bords. On s'est alors demandé si ce mode prélèvement était valable. Les examens histologiques nous ont montré qu'en prélevant un greffon au moyen des ciseaux de Vannas, il existait des lésions des bords du greffon, qui sont alors très irréguliers, et surtout de l'endothélium. Nous avons retrouvé en cela les résultats de Brightbill (3) qui a montré que par voie épithéliale le prélèvement d'un greffon entraînait la perte du 1/5e externe de l'endothélium alors que par voie endothéliale on observait une intégrité presque complète de cet endothélium.

L'aplatissement des bords n'est donc dû qu'à une déturgence traumatique du stroma correspondant, sans conséquences pour le devenir de ce greffon, comme en témoignent les résultats cités plus loin.

β Contrôle post-opératoire.

- Les lapins ont été examinés 3 fois par semaine avec injections sous conjonctivels d'une association corticofides + antibiotiques et des instillations quotidiennes (autant que possible) de cette même association.

- Les critères de contrôle qui portent tant sur la cornée réceptrice que sur les greffons sont :

- . La clarté ou la transparence qui dépend évidemment de l'existence et de l'importance d'un oedème.
- . L'existence de vaisseaux, leur extension avec schéma approximatif.
- . L'importance de l'anneau limitant, son aspect.
- . L'existence d'une chambre antérieure, sa profondeur, l'existence de synéchies antérieures et postérieures, d'hyphéma, d'hypopiun,
- . L'aspect global de l'oeil, l'importance des sécrétions, de la réaction inflammatoire...

γ Classification des résultats.

- Nous avons adopté un délai de un mois pour classer les résultats en bons, moyens et mauvais :

- . Bon résultat : greffon transparent d'épaisseur normale à travers lequel on voit très bien les détails de la chambre antérieure.
- . Résultat moyen : greffon opaque localement ou présentant une discrète nébulosité superficielle. On distingue assez mal les détails de la chambre antérieure.
- . Résultat mauvais : greffon oedématié, opaque ou ulcéré ne laissant pas voir les détails de la chambre antérieure.

- Ce délai de un mois est à notre avis suffisant, chez le lapin du moins, pour apprécier le résultat final. Les modifications évolutives sont presque inexistantes au delà de cette période dans notre expérimentation alors que Bernard (2) a trouvé, qu'on ne

pouvait juger définitivement de la greffe expérimentale chez le lapin avec greffon frais qu'après 8 à 10 semaines.

- Qu'ils restent clairs ou opaques, l'évolution des greffons est identique au début. En effet, ils sont toujours clairs au début, les trois premiers jours en moyenne. A partir de cette date va se préciser l'avenir du greffon. S'il reste clair jusqu'au 15^e jour, il a toutes les chances de le rester ensuite. Par contre, un greffon oedématié avant ce cap présente, sauf quelques exceptions, un mauvais pronostic :

α Dans les cas favorables (photo 1) le greffon restera toujours clair après la deuxième semaine, sauf dans 2 circonstances particulières :

- la première est l'existence d'une hypertonie due à un bloc pupillaire par séclution et qui se traduit par une buphtalmie avec quand même conservation de la transparence cornéenne pendant quelques jours;
- La seconde est plus particulière puisqu'il s'agit d'une opacification "par en avant". Elle débute en effet, sur un greffon clair, par une ulcération superficielle du greffon qui va s'étendre et alors reposer sur une infiltration du stroma en regard. L'arrêt de la corticothérapie entraîne alors la guérison de cette ulcération mais l'opacification résiduelle est fréquente, parfois très localisée.

β Dans les cas défavorables, le greffon présente une évolution toujours identique ou presque. L'oedème apparaît le plus souvent avant le quinzième jour, après la période initiale commune de transparence. Il persistera ensuite, le greffon devenant opaque. Rarement, un greffon oedématié au 15^e jour redeviendra clair.

On voit donc que dans l'ensemble, l'évolution se fait d'un seul tenant que le résultat final soit favorable ou non.

γ Dans les cas intermédiaires, nous avons classé les greffons présentant :

- soit une transparence moyenne due à une nébulosité superficielle
- soit une opacité localisée (1/4 ou 1/2). Dans le dernier cas, le contrôle histologique montre des altérations manifestes des cellules endothéliales, localisées en regard de l'opacité.

- Sur 138 kératoplasties, 112 seulement ont pu être utilisées dans l'appréciation des résultats. Les 26 lapins restant (18 %) ont été exclus de notre statistique en raison d'accidents intercur -

rents sans relation avec la qualité du greffon lui-même :

- paraplégie due aux efforts du lapin pour dégager sa tête de la cage au moment de l'anesthésie. La fracture de la colonne vertébrale qui en résulte parfois n'est alors constatée que lors du premier contrôle post-opératoire.
- maladie intercurrente ayant entraîné la mort du lapin avant un mois.
- hypopion (précautions d'asepsie insuffisantes à l'intervention)
- Synéchie annulaire antérieure totale
- Hyphéma ne regressant pas et entraînant une opacification très précoce du greffon.

- Nous n'avons pas éliminé de la statistique les lapins ayant une synéchie antérieure localisée car, il nous a semblé que si elle constituait un élément péjoratif (34), elle était insuffisante à assurer à elle seule l'échec opératoire. En effet le pourcentage de succès et d'échecs est sensiblement le même en cas de synéchie antérieure localisée.

- Le problème le plus difficile de cette surveillance clinique a été l'appréciation de la responsabilité respective de la réaction immunologique, d'une infection intercurrente et de la fragilité du greffon.

En dehors des cas évidents cités plus haut, nous avons admis que tout échec était dû à une déficience endothéliale. L'évolution d'un seul tenant et les lésions histologiques importantes toujours retrouvées dans les cas défavorables sont les arguments en faveur de cette interprétation.

b - Contrôle histologique.

. Effectué par O. Taillebourg, il a porté sur 2 points :

- Etude des greffons dégelés non greffés
- Etude des greffons greffés à différents moments de l'évolution pour établir la correspondance entre l'histoire clinique et l'aspect microscopique du greffon.

La technique employée pour ce contrôle est la suivante :



Photographie 1 — Greffon transparent chez 1 lapin de 4 mois 1/2

α Pour l'examen histologique de l'endothélium à plat .
méthode décrite par Laflamme (20 bis).

La cornée décongelée est plongée aussitôt dans le fixateur de Carnoy pendant 30 minutes, puis placée, une minute environ, dans l'alcool à 60° à + 4° C. . Elle est ensuite posée dans un verre de montre sur sa face épithéliale et on emplit sa concavité endothéliale avec l'hématoxyline de Harris pendant 10 minutes. Après lavage et virage à l'eau du robinet, la cornée est coupée en plusieurs morceaux, manipulation qui se fait dans l'alcool à 60°. La membrane de Descemet portant l'endothélium est séparée du stroma sous stéréo-microscope au moyen de pinces très fines. Elle est ensuite étalée sur des lames après déshydratation et montée au DPX.

β Méthode d'examen en microscopie électronique
 la cornée dégelée est plongée aussitôt dans le fixateur (glutaraldéhyde 3 % pendant 2 heures et demi). A ce stade la cornée est découpée en fragments très fins et orientés.

Après rinçage dans le tampon Sörensen (pH 7,3) elle est laissée douze heures dans du tétroxyde d'osmium à 1 % (acide osmique).

Après une déshydratation progressive dans différents alcools, et deux bains de 15 minutes en oxyde de propylène, on procède à l'inclusion dans un mélange araldite-Epon.

L'inclusion terminée, les coupes sont faites à l'ultramicrotome M T2 Poster Blum et colorées à l'uranyle (solution saturée dans l'alcool à 50 °) pendant 30 minutes.

Elles sont ensuite examinées au microscope électronique (Philips EM 300).

II - RESULTATS

A - EXPERIMENTATION PRELIMINAIRE : Rôle du DMSO

Nous avons pratiquées sur 3 lapins sous anesthésie générale une autogreffe dans les conditions suivantes :

- prélèvement d'un greffon de 8 mm après injection d'héparine dans la chambre antérieure.
- trempage de ce greffon dans les quatres solutions successives de DMSO à + 4° C.
- suture du greffon sur les lapins toujours endormis.

Les greffons sont restés tout à fait transparents, ce qui permet d'éliminer la responsabilité du liquide protecteur dans les échecs de la kératoplastie avec greffons conservés.

Nous avons noté cependant une irritation persistante du globe pendant plusieurs semaines. Il est difficile de conclure avec certitude sur l'origine de cet aspect. Il nous a semblé qu'il était dû à un rinçage insuffisamment prolongé après trempage dans le DMSO. En effet le lapin restant anesthésié et le globe ouvert pendant toutes les manipulations (20 minutes pour le seul trempage dans les solutions de DMSO), nous avons été obligé de raccourcir le temps du rinçage. Contre, cette hypothèse, on peut opposer l'avis de Edel Hauser (6) qui signale que 65 % du DMSO serait éliminé après 10 minutes de rinçage, et le reste par le renouvellement de l'humeur aqueuse. Même si chez ces 3 lapins il restait plus que 40 % du DMSO imprégnant le greffon au moment de l'intervention, on peut supposer qu'il serait éliminé après quelques jours par l'humeur aqueuse. Or, cet aspect inflammatoire a persisté plusieurs semaines...

B - PERSISTANCE DES CELLULES DU DONNEUR SUR LE GREFFON (photo 2).

Il est en effet intéressant de savoir si l'endothélium du donneur se maintient ou est remplacé par celui du receveur.

En vue de cette recherche nous avons congelé uniquement des cornées de lapin femelle qui ont ensuite été greffées sur des lapins mâles.

Dans tous les cas où les cellules endothéliales avaient gardé une morphologie suffisamment proche de la normale pour permettre une étude structurale convenable, le pourcentage moyen de corps de Barr retrouvé sur le greffon était de 55-60 %. Ces chiffres correspondent à la quantité habituellement retrouvée dans l'endothélium femelle frais.

Cette étude ayant été faite sur des greffons d'âge variable, allant jusqu'à 6 mois, on peut donc affirmer que l'aspect post-opératoire d'un greffon est bien dû à son endothélium primitif et non à la repousse de l'endothélium du receveur.

Nous avons retrouvé en cela les résultats des travaux de Lee et d'autres auteurs (1, 8, 21), qui ont montré par la même étude des chromatines sexuelles que les cellules de donneur persistaient après un délai supérieur à 2 ans.

C - TRANSPARENCE DU GREFFON.

1 - Résultats globaux.

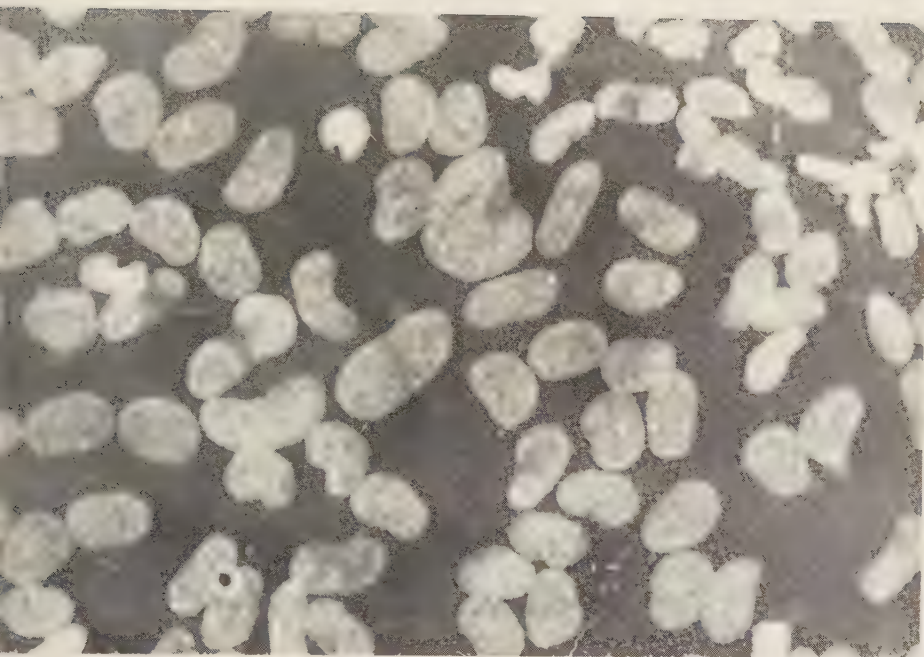
Sur les 112 lapins que nous avons fait entrer dans cette statistique, nous avons obtenu :

- 63 bons résultats soit 56,3 %
- 9 moyens résultats soit 8 %
- 40 mauvais résultats soit 35,7 %

Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus par Bernard (2) dans une série de 61 homogreffes chez le lapin, pratiquées dans les mêmes conditions opératoires que les nôtres et qui obtient 47 % de bons résultats, on constate que les pourcentages de succès sont au moins aussi favorables dans la série d'homogreffes congelées que dans la série d'homogreffes fraîches.

Ceci serait un argument en faveur de la qualité de l'endothélium des greffons congelés. L'on doit cependant signaler une restriction : tous les lapins de notre série ont été soumis à une corticothérapie locale notable et continue alors que dans la série d'homogreffes fraîches, les lapins n'ont eu aucun traitement post-opératoire.

Si on admet la théorie selon laquelle le lapin serait un animal immunologiquement peu compétent (2), on pourrait alors



Photographie 2 — Endothélium à plat du greffon transparent de plus de 2 mois
Corpuscules de Barr sur l'endothélium du donneur, prouvant la
persistance de cet endothélium dans les greffons restés clairs.

conclure, en comparant ces 2 séries de greffes, en la bonne valeur de cette méthode de conservation des cornées. Cependant :

- Sicault et Payrau (31) trouve 80 % de succès dans des autogreffes et surtout
- Laflamme a montré le rôle déterminant de cette corticothérapie dans le succès des homogreffes transfixiantes avec greffons congelés :
 - . 17 % de bons résultats sans corticothérapie
 - . 50 % de bons résultats avec corticothérapie

En l'absence donc d'autres statistiques dans la littérature portant sur les homogreffes fraîches avec ou sans corticothérapie, il nous est impossible de dire si l'action de la cortisone en post-opératoire, très favorable dans le cas des greffons congelés, a porté :

- Sur une réaction immunitaire et dans ce cas elle améliorerait très certainement les statistiques des homogreffes fraîches.
- Ou sur une réaction inflammatoire non spécifique notamment au DMSO restant dans les cellules.

α Il faut signaler que dans notre expérimentation les produits utilisés contenaient une association corticoïdes-antibiotiques. Ces examens histologiques montrant dans les mauvais résultats cliniques, et avec une grande fréquence, la présence de polynucléaires qui témoignent probablement d'une infection, on pourrait se demander dans quelle mesure ce traitement antibiotique ne jouerait pas un rôle important à lui seul, l'expérimentation de Laflamme (22) ayant montré le rôle des corticoïdes isolés.

2 - Rôle des conditions de congélation.

Les différents temps de la congélation sur lesquels il est possible d'agir sont essentiellement au nombre de trois :

- . le liquide de congélation
- . la courbe de congélation
- . le dégel.

Nous avons vu que le liquide le plus favorable semble être celui décrit plus haut, que le dégel doit être très rapide. Il nous reste donc à intervenir sur un facteur, la courbe de congélation.

C'est sur l'étude de cette courbe et le contrôle clinique de différentes modifications effectuées qu'a porté cette série expérimentale.

La courbe de congélation programmée donne une courbe d'enregistrement qui peut se décomposer en 4 parties :

α Le refroidissement de la température de départ qui se situe entre $+ 4^{\circ} \text{C}$ et $+ 9^{\circ} \text{C}$ jusqu'à 0°C .

β La période de surfusion entre 0°C et le commencement du dégagement de chaleur et du réchauffement qui annonce la congélation elle-même. Elle se situe entre $- 9^{\circ} \text{C}$ et $- 12^{\circ} \text{C}$.

γ Le plateau de congélation durant lequel la température augmente d'abord (dégagement de chaleur due à la congélation) puis redescend.

ξ La reprise d'un refroidissement continu après congélation complète ($- 12^{\circ} \text{C}$ à $- 50^{\circ} \text{C}$).

Nous avons pris pour base de travail une courbe programme appelée courbe A. L'enregistrement d'une courbe de refroidissement obtenue avec ce programme A est donné par le thermocouple au contour de la cornée témoin (photo 3), ou courbe n° 3. L'on peut y voir que le début du réchauffement lié à la congélation se manifeste par une divergence entre la courbe n° 3 et la courbe n° 2 (température de l'intérieur du boîtier où le réchauffement n'est pas sensible).

En faisant varier les différents éléments de la courbe 3, nous avons obtenu les résultats suivants :

α Modifications portant sur la vitesse de refroidissement de la température du départ à 0°C .

	$< 5^{\circ}/\text{mn}$	$\geq 5^{\circ}/\text{mn}$
succès	18	39
échecs	14	26
Pourcentage succès	56 %	60 %

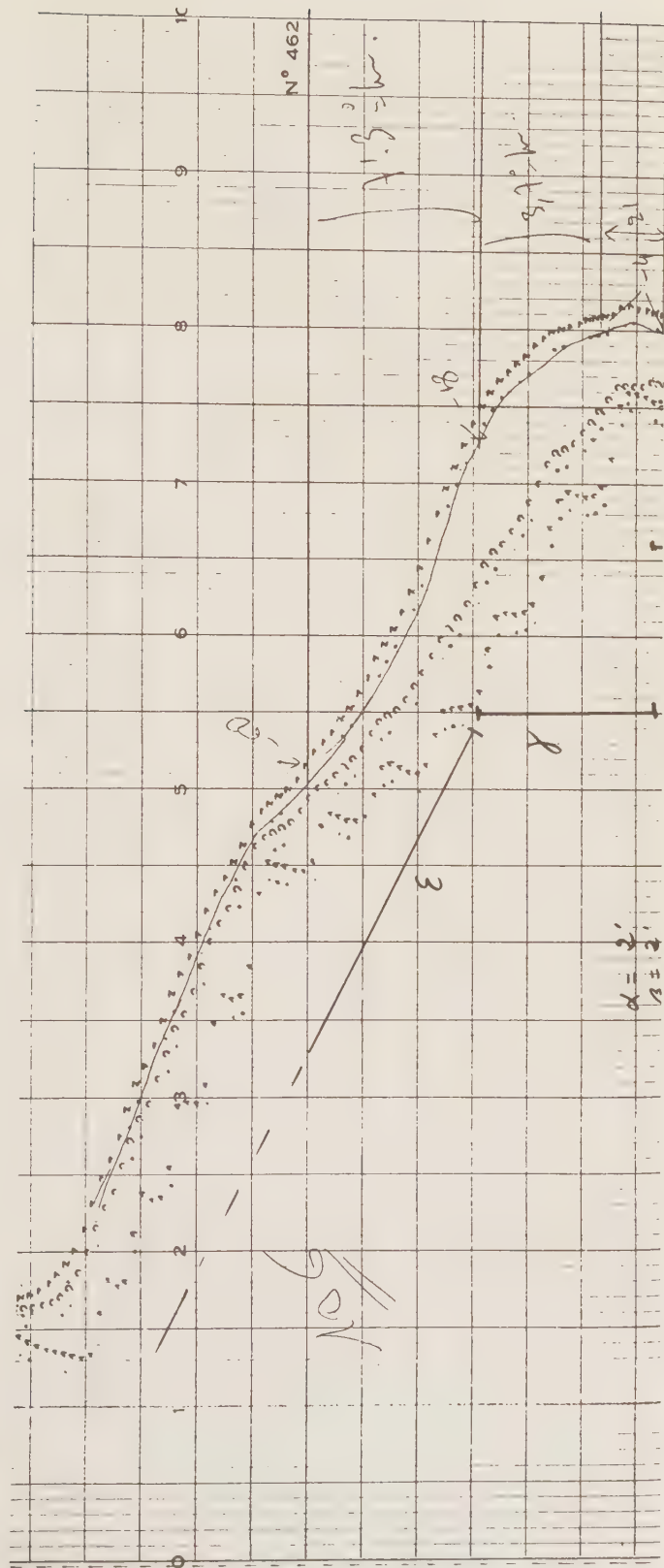
Les résultats sont peu significatifs sur ce temps et nous avons adopté une vitesse moyenne voisine de $5^{\circ}/\text{mn}$.

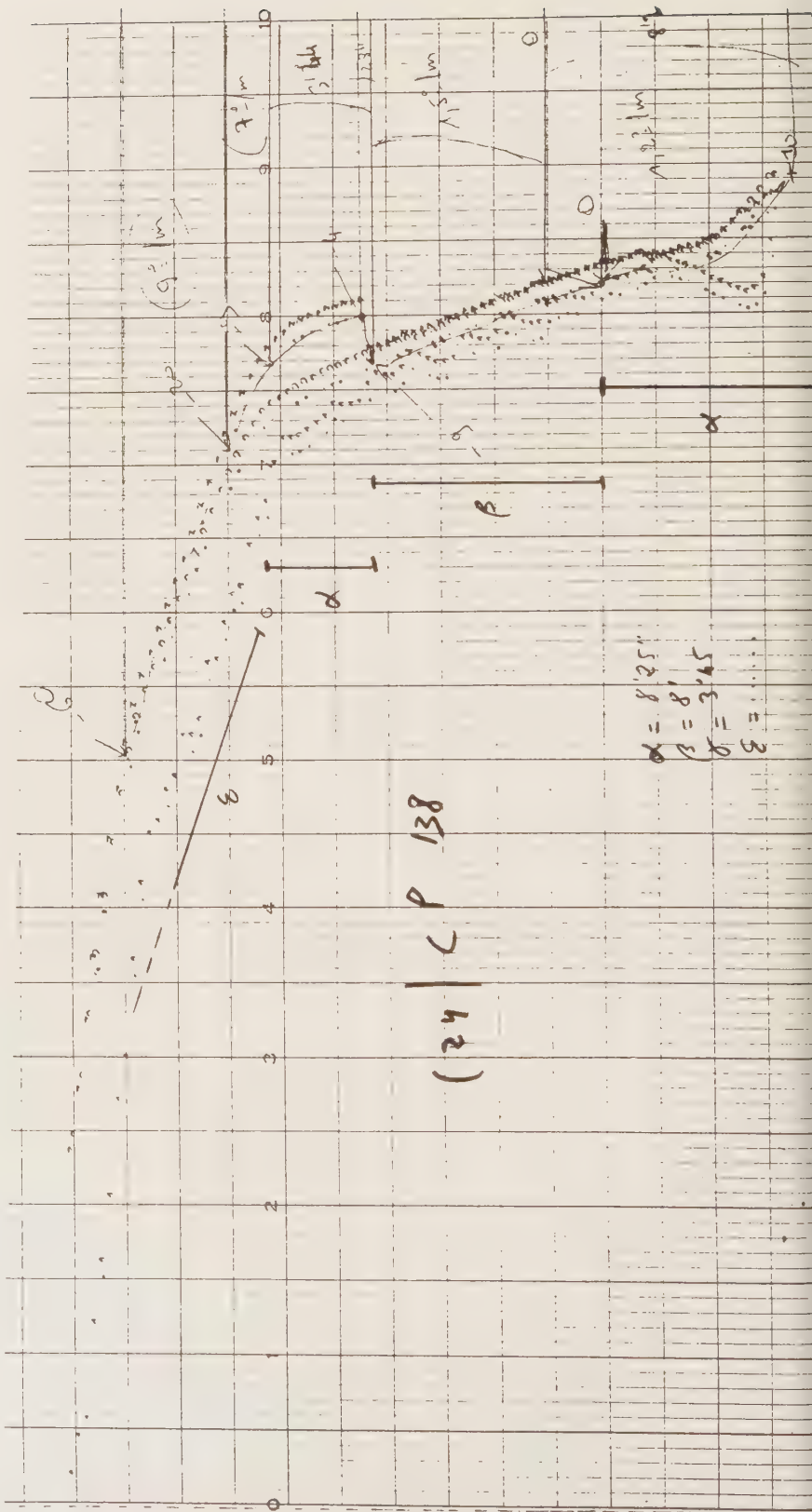
Deux exemples de courbe d'enregistrement détaillée :

- α refroidissement de la température de départ jusqu'à 0°C
- β période de surfusion
- γ plateau de congélation
- ϵ refroidissement continu jusqu'à -196°C

Nous voyons que la période de surfusion de la courbe d'enregistrement 138 est nettement supérieure à celle de la courbe 106.

Les kératoplasties de la série 138 ont donné de meilleurs résultats que celle de la série 106.





(24) C P 138

$$\begin{array}{r} 3 \\ = \\ 3 \\ = \\ 3 \\ = \\ 3 \\ = \\ 3 \end{array}$$



β Modifications portant sur la vitesse de la période de surfusion.

	$< 2^{\circ}/mn$	2 à $4^{\circ}/mn$	$\geq 4^{\circ}/mn$
succès	20	27	10
échecs	6	25	9
pourcentage succès-échecs	77 %	52 %	52 %

Ici les résultats sont probants et nous voyons donc que la vitesse de la courbe de refroidissement pendant la période de surfusion doit être inférieure à $2^{\circ}/mn$. Ce résultat est d'ailleurs confirmé par le tableau suivant :

γ Modification portant sur la durée de la surfusion (photo 3).

	$< 2'$	2 - 3'	$\geq 3'$
succès	20	16	19
échecs	21	14	5
pourcentage succès-échecs	48,7 %	53,3 %	75,8 %

Les résultats sont donc meilleurs si on allonge la durée de la surfusion. Dans la courbe β la durée de la surfusion a été volontairement rendue supérieure à 30 minutes. Dans ces conditions, et sur une expérience limitée, parce que encore en cours, nous avons eu un pourcentage de succès supérieur à 65 %.

ξ - Modifications portant sur la durée du plateau du réchauffement.

	$< 2 mn$	$\geq 2 mn$
succès	18	39
échecs	14	26
pourcentage succès-échecs	56 %	60 %

Ces chiffres ne permettent aucune conclusion pratique mais le réchauffement qui se produit avant la congélation elle-même, étant sûrement un élément défavorable, nous avons toujours essayé de le réduire au minimum (< 1 minute). La durée totale du plateau thermique avant que la courbe de refroidissement ne reprenne sa courbe régulière a varié de 1 minute à 5 minutes.

De toutes ces modifications, la plus bénéfique est sans conteste la prolongation de la période de surfusion. Actuellement, sur l'expérimentation qui se poursuit, les courbes d'enregistrement montrent toutes une surfusion de durée égale ou supérieure à trente minutes.

D - RESULTATS HISTOLOGIQUES.

1 - Histologie des cornées cryoconservées non greffées.

La congélation des cornées même dans les meilleures conditions entraîne des altérations de l'endothélium. Van Horn (15) Kaufman H (17), Laflamme (20) en histologie et Van Horn D L (14) Taillebourg O (34) en microscopie électronique ont toujours signalé des lésions notables.

La couche endothéliale, constamment retrouvée, est beaucoup plus fragile que celle d'une cornée fraîche.

a - Histologie (photographie n°4)

- L'examen histologique classique selon la méthode décrite plus haut met en évidence quatre types de modifications à peu près constantes.

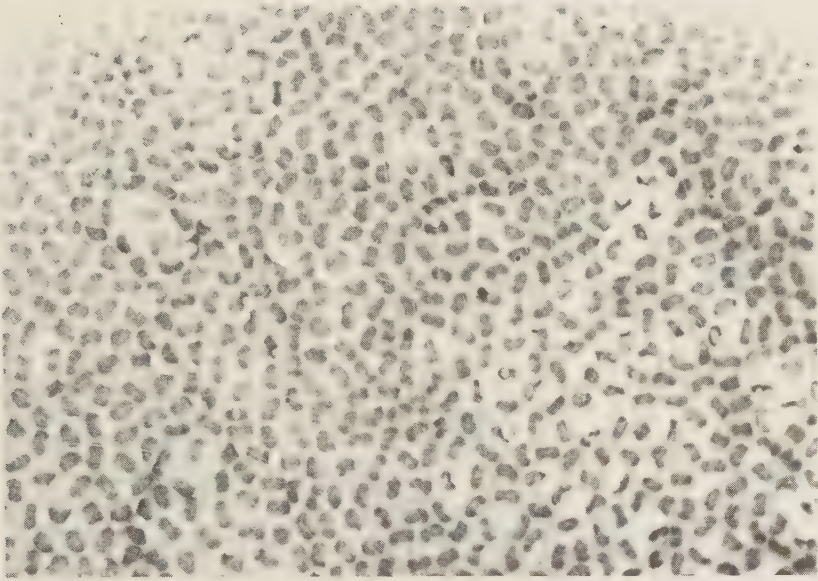
α - Lors du clivage de la descemet chargée de l'endothélium pour l'étalement à plat, l'on constate déjà une nette diminution de l'adhérence de l'endothélio-descemet au stroma par rapport à ce qui est trouvé sur une cornée fraîche.

β - Ce manque d'adhérence se fait sentir également entre la membrane de descemet et les cellules endothéliales. En effet si celles-ci sont réparties globalement sur toute la surface cornéenne, des cellules ou des groupes de cellules ont tendance à se désolidariser laissant des plages de Descemet nues.

γ - L'aspect des noyaux est pratiquement toujours modifié et de façon univoque. Alors que sur une cornée fraîche les noyaux des cellules endothéliales chez le lapin sont réniformes, on trouve sur les cellules congelées des noyaux :

- soit simplement gonflés, ce qui leur donne une forme arrondie ou ovale. Cette déformation peut-être plus ou moins importante.
- soit picnotiques, signant la destruction de la cellule.

ϵ - Le cytoplasme est également modifié : il s'y forme des vacuoles de taille et de nombre variables. Les cellules vacuo-

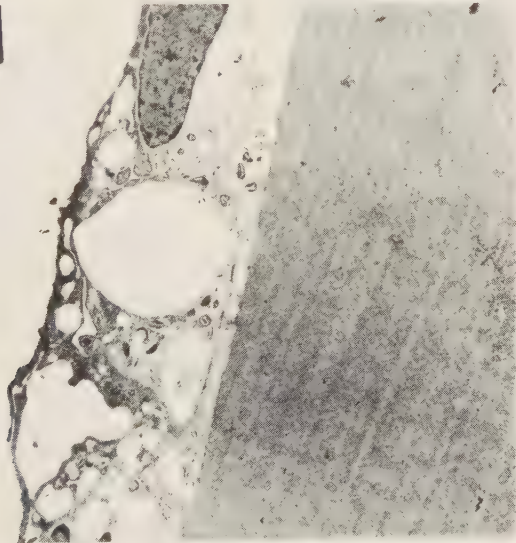


Photographie 4 — Endothélium à plat d'un greffon congelé.

On y voit :

- des noyaux arrondis ou ovalaires, des noyaux pycnotiques
- des plages acellulaires
- des vacuoles intercellulaires

0 7 0 3



Photographie 5 — Sur cette coupe ultrastructurale, on voit bien les vacuoles intercellulaires. Les "Terminal barr" ont cependant un aspect normal. Existence de vacuoles intracytoplasmiques. Sur ce cliché on ne voit pas d'espace entre la cellule endothéliale et la membrane descemétique.

lisées sont souvent groupées par plages, donnant à l'ensemble un aspect tacheté.

- Ces modifications sont en partie réversibles au cours du temps. En effet :

- dans un certain nombre de séries de cornées congelées en même temps et où l'examen histologique d'une cornée montrait des lésions importantes, faisant augurer d'un mauvais pronostic, les kératoplasties ont donné des résultats satisfaisants.
- des prélèvements étagés dans le temps sur des séries de kératoplasties faites en même temps avec une même série de greffons ont montré l'amélioration progressive de l'état histologique pour arriver à un aspect sensiblement normal au bout de 4 à 6 mois.

A cette époque, le comptage des corps de Barr permettait d'affirmer qu'il s'agissait des cellules du donneur.

Ces deux arguments nous permettent de penser, comme Van Horn D. L. (16) que les altérations cellulaires causées par la cryoconservation sont réversibles.

b - Etude ultrastructurale.

- L'étude ultrastructurale met en évidence plusieurs types d'altérations dont certaines rejoignent celles constatées en histologie (vacuoles) (photographie n° 5).

- . Il existe assez fréquemment un espace entre cellules endothéliales et membrane de Descemet.
- . Il existe aussi souvent un intervalle (vacuole) entre des cellules endothéliales voisines. Les desmotomes restent cependant en place limitant ces intervalles et les "Terminal barr" ont un aspect normal.
- . Enfin, les mitochondries sont très altérées avec disparition des crêtes.

2 - Histologie des cornées congelées et greffées.

a - Greffons clairs.

- Les résultats histologiques dépendent de la date de prélèvement par rapport à la kératoplastie :

α - Au cours des premiers jours, l'histologie montre une intense activité cellulaire au niveau de l'endothélium.

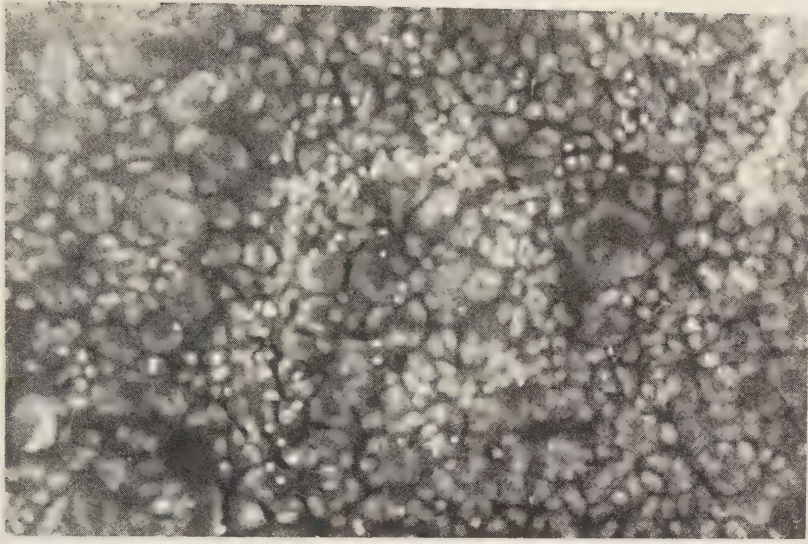
- . Elle est caractérisée (photographie n°6) par de nombreuses mitoses, dont quelques unes sont anormales (mitoses tétrapolaires) et par des cellules plurinuclées.
- . La présence constante de noyaux géants peut-être interprétée comme une réaction endothéliale spécifique

- Du point de vue ultrastructural (photographie n°7) l'endothélium présente un aspect d'autant plus normal que la greffe est ancienne et transparente. la photographie n° 7 montre que :

- . l'endothélium est adhérent à la membrane de Descemet.
- . il n'y a plus d'espace intercellulaire
- . Les "terminal barr" sont présents dans toutes les cellules.
- . Les mitochondries sont normales et il n'y a pas de vacuoles cytoplasmiques. au froid. En effet ce même type de noyau est retrouvé au niveau de l'endothélium après cryothérapie cornéenne.
- . Dans l'ensemble les noyaux sont arrondis ou ovalaires. Ils sont très rarement réniformes comme sur les homogreffes fraîches à ce stade.
- . La densité cellulaire par unité de surface descémétique est nettement inférieure à celle retrouvée sur une cornée fraîche.

β - Au bout de quelques semaines, les mitoses sont beaucoup plus rares, mais on retrouve toujours des cellules plurinuclées. Les noyaux géants sont présents.

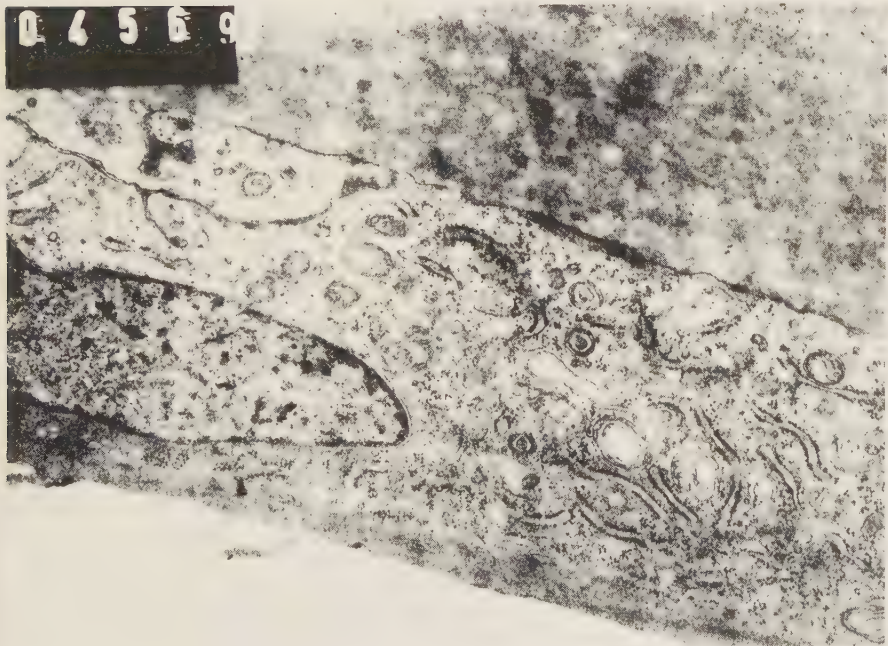
- . Les noyaux sont toujours arrondis ou ovalaires. quelques uns ont un aspect réuniforme normal.
- . La densité cellulaire par unité de surface descémétique est nettement plus importante.



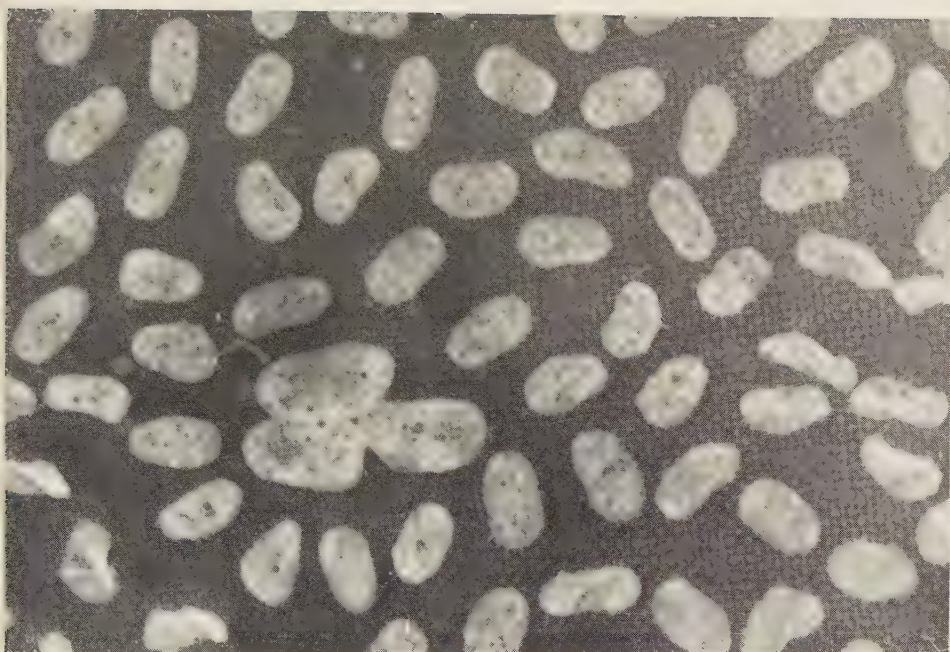
Photographie 6 — Endothélium à plat d'un greffon congelé de 24 heures

On note :

- le grand nombre de cellules plurinucléées
- des noyaux géants
- l'abondance des mitoses



Photographie 7 — Coupe ultrastructurale de l'endothélium d'un greffon transparent de 2 mois.



Photographie 8 — Endothélium à plat d'un greffon transparent de 2 mois 1/2

On note :

- une densité cellulaire normale
- la présence de noyaux géants
- la fréquence de noyaux arrondis ou ovalaires contrastant avec l'aspect réniforme normal du noyau rarement retrouvé ici

Y - Au bout de quelques mois (photographie n° 8)
l'endothélium présente un aspect sensiblement normal.

- . les cellules sont de forme et de taille régulière et leur densité par unité de surface est normale,
- . les noyaux toutefois ont un aspect ovalaire dans l'ensemble mais ceux qui sont réniformes sont nettement plus nombreux,
- . Il y a toujours des noyaux géants,

- On s'aperçoit donc que plus la greffe est récente, plus la densité cellulaire est faible. Si l'on ajoute à cela l'intense activité mytotique du début on peut en conclure que la congélation a détruit une certaine quantité de cellules endothéliales. Ces résultats sont retrouvés dans une étude de Van Hom (16) qui a montré que 50 % seulement des cellules endothéliales d'une cornée cryoconservée incorporaient l'uridium tritiée et étaient donc viables.

Il existerait donc une régénération "in situ" de l'endothélium du greffon pendant les premières semaines qui suivent la kératoplastie.

b - Greffons opaques.

L'opacité du greffon s'explique toujours par des lésions importantes au niveau de l'endothélium.

- Celui-ci peut être absent ou, remplacé par une membrane conjonctive (membrane rétrodesccemétique).

- Il peut présenter aussi de grandes lacunes acellulaires.

- Il peut être infiltré par de petites cellules qui se superposent en plusieurs couches. Il est vraisemblable que ce soit des polynucléaires et il faut signaler la fréquence de cette constatation dans les mauvais résultats. Nous pensons que les phénomènes infectieux ont une part importante dans le pronostic de ces greffons.

c - Exemples de résultats cliniques controlés par l'histologie.

Lapin 80 : cornée de lapin mâle greffée sur lapin femelle.

- . Clinique
 - greffon très clair pendant toute l'évolution.
 - deux mois après l'intervention la cornée réceptrice est très vascularisée avec une

sorte d'anneau vasculaire autour de l'anneau limitant

. Histologie

- greffon : -noyaux régulièrement répartis, ovalaires ou réniformes. Il existe des noyaux géants, **pas** de corps de Barr.
- receveur : noyaux réniformes avec corps de Barr

Lapin 106 : cornée de lapin femelle sur lapin mâle

. Clinique Beau greffon après deux mois et demi

. Histologie

- greffon : noyaux ayant presque repris un aspect normal. Ils sont le plus souvent réniformes ou ovalaires avec des corps de Barr.
le nombre de cellules par unité de surface est égal à celui du receveur.

il y a des noyaux géants dispersés sur l'ensemble du greffon.
- receveur : endothélium normal dans l'ensemble avec noyaux réniformes sans corpuscules de Barr

Lapin 96 : lapin femelle sur lapin mâle

. Clinique greffon très clair pendant 12 jours puis apparition d'un oedème superficiel le 13e jour.
Au 20e jour, greffon très oedématié.

. Histologie

- greffon : endothélium altéré avec noyaux de toutes formes et de toutes tailles. Présence de polynucléaires.
- receveur : noyaux réniformes ou ovalaires, présence aussi de polynucléaires.

Lapin 97 : lapin femelle sur lapin mâle

- . Clinique greffon très clair pendant 11 jours puis apparition d'un oedème avec appel vasculaire.
le greffon sera très oedématié le 20e jour.
- . Histologie : endothélium du greffon très attéré avec des zones envahies par des noyaux très denses et des polynucléaires.

Lapin 78 : lapin femelle sur lapin mâle

- . Clinique très beau greffon pendant 15 jours puis apparition d'un oedème qui deviendra net surtout au 35e jour. Le greffon se dégonflera après pour garder une nébulosité superficielle.
- . Histologie noyaux répartis, également, sur toute la surface.
la majorité de ces noyaux présente un aspect normal, quelques uns sont très altérés. Présence de quelques noyaux géants.

Lapin 91 : lapin femelle sur lapin mâle

- . Clinique greffon clair pendant 8 jours. Extension ensuite de l'anneau limitant avec vascularisation très importante.
- . Histologie (17e jour).
altération des cellules endothéliales surtout dans la zone périphérique du greffon (anneau limitant ?).
vers le centre, le pourcentage des noyaux ayant un aspect normal est plus élevé mais on note quelques zones dépourvues de cellules (pas de noyaux).

- En se basant sur ces descriptions cliniques, histologiques, nous voyons qu'il existe un rapport entre la transparence du greffon et l'état de son endothélium.

- L'échec clinique d'une greffe s'accompagne d'altération histologique de l'endothélium. Il existe cependant des résultats

paradoxaux pour lesquels nous n'avons pas d'explications, comme le montre l'exemple suivant :

Lapin 99 : cornée femelle sur cornée mâle

. Clinique : Beau greffon

. Histologie au 25e jour :

Noyaux de forme ovale en général.
Quelques uns sont géants, d'autres
pycnotiques.

Il existe une zone centrale et une autre
périphérie où les noyaux sont altérés,
plus denses et semblent souvent empilés.
Présence de polynucléaires.

III - DISCUSSION

Avant de commenter les résultats obtenus en fonction des modifications apportées à la méthode de congélation, nous les comparerons à ceux obtenus par Laflamme (20), qui a opéré dans les mêmes conditions que celles du début de notre expérimentation.

- Nos meilleurs résultats 56,3 % au lieu de 50 % chez Laflamme et cela sur un nombre beaucoup plus important de cas, 112 Lapins au lieu de 24, montrent que la méthode est perfectible. En décomposant nos chiffres, nous nous sommes rendus compte que durant la deuxième moitié de notre expérimentation, le pourcentage de bons résultats était nettement meilleur que pendant la première moitié. Or, c'est pendant cette deuxième période que nous avons augmenté progressivement le temps de la surfusion.

- Actuellement, c'est sur ce facteur essentiel qu'il est possible d'agir pour améliorer encore les résultats, les manipulations en chambre stérile, le prélèvement de la cornée sans anneau stéril, le dégel rapide à température ambiante et l'amélioration de la technique opératoire étant des temps sur lesquels il est difficile d'obtenir une amélioration.

- Au sujet du contrôle post-opératoire, tant en clinique qu'en histologie, il nous a toujours été difficile de faire la part de ce qui revient à l'infection (polynucléaire), à un phénomène de réaction immunologique ou à la qualité du greffon (les accidents mécaniques étant les plus faciles à dépister). Il est certain qu'il existe un phénomène immunologique important, les résultats comparatifs de Laflamme en témoignent. Cela va en contradiction avec la réputation du Lapin comme animal immunologiquement peu compétent.

- Nous avons montré que c'était l'endothélium du donneur qui assurait la transparence du greffon. Toutefois, il nous semble que, dans les jours qui suivent une kératoplastie avec greffon conservé, la déturgescence du greffon n'est assurée que par un certain nombre de cellules endothéliales.

Deux arguments nous permettent de l'affirmer :

- la constatation des lésions endothéliales observées dans les cornées non greffées et retrouvées au moment de la période post opératoire immédiate. Rappelons que Van Horn a montré par l'incorporation de l'uridium tritié que seulement 50 % des cellules endothéliales étaient viables sur une cornée cryo-conservée (15).
- la multiplication anarchique d'un grand nombre de cellules pendant cette période post-opératoire. Ces cellules ne sont surement pas fonctionnelles avec les anomalies importantes qu'elles présentent (mitoses tétrapolaires, cellules plurinuclées, noyaux géants).

Il est donc probable que la greffe ne reste claire qu'à partir d'un certain pourcentage-seuil de cellules en bon état.

GINSBURG J. P. (13), WEEKERS J. F. (36), ont montré récemment que la surveillance de l'épaisseur du greffon en post-opératoire était un excellent moyen d'apprécier la vitalité de l'endothélium.

Nous nous proposons au cours de l'expérimentation qui continue d'utiliser cette méthode pour savoir à partir de quelle période on pourra considérer comme viable l'endothélium du greffon. La proportion de cellules endothéliales survivantes nécessaire à la réussite de la greffe pourrait être alors délimitée par l'histologie.

IV - CONCLUSION

La kératoplastie transfixiante chez le lapin au moyen de cornées cryoconservées sous protection de diméthylsulfoxyde donne des résultats satisfaisants lorsque tous les animaux sont soumis à une corticothérapie post-opératoire.

Notre travail a consisté à contrôler les modifications portées à la méthode décrite par Gajdos Preuss, par deux critères : la kératoplastie transfixiante et l'étude histologique.

Nos résultats opératoires (56,3 % de succès sur 118 lapins opérés), en amélioration par rapport à la série précédente (50 % de succès sur 24 lapins opérés - Laflamme -), montre que la méthode est certainement perfectible.

En ce qui concerne l'histologie et l'étude ultrastructurale, certaines lésions sont constamment retrouvées sur les cornées congelées non greffées. Ces mêmes lésions disparaissent rapidement sur les greffons restés transparents. Il persiste cependant, même après plusieurs mois, une morphologie différente des noyaux des cellules endothéliales qui sont parfois arrondis ou ovalaires au lieu d'être réniformes.

L'appréciation de la transparence du greffon est certainement une méthode globale valable pour juger de la qualité d'un greffon. Elle ne permet pas cependant de connaître la période à partir de laquelle l'endothélium du greffon est fonctionnel et assure sa transparence.

Nous nous proposons de nous servir de la pachymétrie pour essayer de délimiter cette période et préciser alors par l'histologie le pourcentage minimum de cellules endothéliales viables compatibles avec la transparence du greffon.

Nous avons montré par l'étude de la chromatine sexuelle que l'endothélium du greffon persistait et qu'il régénérât lui-même sans intervention de l'endothélium du receveur, comblant ainsi les pertes cellulaires causées par la congélation. Ces nouvelles cel-

lules ne sont peut être pas fonctionnelles au début, si on se base seulement sur leur aspect morphologique.

L'application de cette méthode à la conservation des cornées humaines est en cours. Il nous paraît cependant qu'il y a une condition indispensable à remplir : le prélèvement très précoce des globes du donneur, pour éviter d'ajouter aux lésions endothéliales dues aux mauvaises conditions de conservation des corps dans les amphithéâtres, les lésions propres de la congélation.

Vu, le Président de Thèse :
Professeur G. OFFRET

Vu, le Doyen de la Faculté de
Médecine Broussais - Hôtel Dieu
Professeur MILLIEZ

Vu et Permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
R MALLET

BIBLIOGRAPHIE

1. - BASU (P. K.), MILLER (I.), ORMSBY (H. L.). -
Sex chromatin as a biologic cell marker in the study of
the Fate of the corneal transplant.
Am. J. Ophtal. 49, 513-515, 1960.
2. - BERNARD (J. A.). -
Etude expérimentale de l'homogreffe transfixiante de
cornée chez le lapin. Conséquences cliniques et anatomo-
pathologiques.
Thèse 1969. Paris.
3. - BRIGH BILL (F. S.), POLACK (F. M.), SLAPPEY (T.). -
A comparaison of two méthodes for cutting donor corneal
buttons.
Am. J. Ophtal. 75 : 3, 500-506, 1973.
4. - CAPELLA (J. A.), KAUFMAN (H. E.), ROBBINS (J. E.). -
Preservation of viable corneal tissue
Arch. Ophtal. (Chicago) 74, 669-673, 1965.
5. - CAPELLA (J. A.), KAUFMAN (H. E.), ROBBINS (J. E.). -
Preservation of viable corneal tissue
Cryobiology 2, 116-121, 1967.
6. - CHI (H. H.), TENG (C. C.), KATZIN (H. M.). -
Histopathology of corneal endothelium after freezing.
Int. Ophtal. Clin. 7, 369-380, 1967.

7. - EDELHAUSER (H. F.), GALLUN (A. B.), VAN HORN (D. L.), SCHULTZ (R. O.), -
 Uptake and removal of DMSO in rabbit and human corneas during cryopreservation.
 Criobiology (Milwau Kee, Wisc. 53 233) 8 : 1, 104-107.
8. - EDELHAUSER (H. F.), VAN HORN (D. L.), GALLUN (A. B.), SCHULTZ (R. O.), -
 Experimental rehydration of cryopreserved corneal tissue.
 Investig. Ophtal. 10 : 2, 100-107, 1971
9. - ESPIRITU (R. B.), TENG (C. C.), KATZING (H. M.). -
 Studies of the Realing of corneal grafts
 Amer. J. Ophtal. 52, 90-95, 1961.
10. - FAURE (J. P.), KIM (Y. Z.), PAYRAU (P.). -
 Une méthode de conservation des cornées à basse température.
 Arch. Ophtal. (Paris), 27, 781-788, 1967.
11. - FAURE (J. P.), KIM (Y. Z.), GRAFT (B.). -
 Giant cells in the corneal endothélium during its regeneration after destruction by freezing.
 Exp. Eye Res. 12, 6-12, 1971.
12. - GAJDOS-PREUSS (A. G.). -
 Conservation de la cornée aux basses températures. Techniques et contrôle d'efficacité.
 Thèse médecine (Paris). 1970.
13. - GALLUN (A. B.), SCHULTZ (R. O.). -
 Evaluation of cryopreserved cornea by intra-lamellar keratoplasty.
 Invest. ophtal. 9 : 7 551 1970.
14. - GINSBERG (S. P.), CAPELLA (J. A.), KAUFMAN (H. E.). -
 Normal patterns of corneal thinning after penetrating keratoplasty using refrigerated and cryopreserved donor material.
 Amer. J. Ophtal. 73 : 4, 555-559, 1972.

15. - HORN VAN (L. D.), -
 Ultrastructural changes in cryopreserved corneal tissue
 Invest. Ophthal. 9 : 7 551 1970.
16. - HORN VAN (D. L.), EDELHAUSER (H. F.) et coll. -
 Reversibility of ultrastructural freeze-thaw-induced injury
 Arch. ophthal. (Chicago) 87:4, 422-426, 1972.
17. - HORN VAN (D. L.), SCHULTZ (R. O.), HANNA (C.). -
 Corneal cryopreservation. Ultrastructural and viability
 changes.
 Arch. ophthal. (Chicago) 84 : 5, 655-667, 1970.
18. - KAUFMAN (H. E.). -
 Preserving corneas by freezing
 Arch. ophthal. (Chicago) 73, 907-908, 1965
19. - KAUFMAN (H. E.), CAPELLA (J. A.), ESCAPINI (H.),
 KAPLAN (M.), ROBBINS (J. E.). -
 Corneal endothelium and preservation of living corneal
 tissue pp. 869-878, in ophthalmology Proc. xx Int. Cong.
 Munich, 14-19 august 1966. Pt 11 Excerpta Med. Found
 Amsterdam, 1967, Int. Cong. Ser. n° 146.
20. - KAUFMAN (H. E.), ESCAPINI (H.), CAPELLA (J. A.),
 ROBBINS (J. E.), KAPLAN (M.). -
 Living preserved corneal tissue for penetrating keratoplas-
 ty.
 Arch. ophthal. (Chicago) 76, 471-476, 1966.
21. - KAUFMAN (H.). -
 Penetrating keratoplasty with cryopreserved donor tissue.
 Highlights ophthal 13 : 3, 256-258, 1972
22. - LAFLAMME (M.). -
 Mémoire (Paris), 1971.
23. - LAFLAMME (M.). -
 Méthode d'examen histologique à plat.
 Arch. opht. 32, 43-58, 1972.

24. - LEE (W. R.), MUELLER (F. O.), TREVOR-ROPPER (P. D.), -
In vivo survival of the endothélium of freeze-stored corneal
homografts in the rabbits.
Brit. J. Ophthal. , 51 : 5 321-330 1967.
24. - MATHIEU (M. U.), -
Résultats obtenus dans la kératoplastie transfixiante au
moyen de cornées conservées dans l'azote liquide.
Canad. J. ophthal. 5 : 2, 142-145, 1970.
26. - MUELLER (F. O.), -
Short-time experiments on grafting fresh and frozen corneal
tissue in dogs.
Brit. J. ophthal. 52 : 10, 752-762, 1968.
27. - MUELLER (F. O.), -
Experiments on canine corneal donor material stored in
liquid nitrogen.
Brit. J. ophthal. 52, 649, 1968.
28. - MUELLER (F. O.), -
Techniques for full thickness keratoplasty in rabbits, using
fresh and frozen corneal tissue.
Brit. J. Ophthal 48, 377-383, 1964.
29. - MUELLER (F. O.), -
Die gefrierkonservierung des homologen spendermaterials
für die durchgreifende keratoplastik.
Docum. Ophthal. Den Haag 31 : 1 89-140 1972.
30. - PAYRAU (P.), -
Conservation des tissus oculaires par le froid.
(In Moreau (P. G.), Haut (J) : cryoophthalmologie.
Paris, Masson et Cie, 697, 721. 1971.
31. - PENA CARILLO (J.), POLACK (F. M.). -
Histochemical changes in endothélium of corneas stored
in moist chambers.
Arch. Ophthal 72, 811-819, 1964.

32. - POLACK (F. M.), -
 Modified corneal cryopreservation method
 corneal and external diseases of the eye
 Charles C. Thomas Publ.
 Springfield 363-368, 1970.
33. - POLACK (F. M.), -
 Cryoproservation of corneas for penetrating keratoplasty
 Amer. J. Ophthal. 71 : 2, 505-515, 1971.
34. - POLACK (F. M.), SMELSER (G. K.), ROSE (J.). -
 Long term survival of isotopically labelled stromal and
 endothelial cells in corneal homografts.
 Amer. J. ophthal. 57, 67, 1964.
35. - SICAULT (R.), BERNARD (J. A.), PAYRAU (P.). -
 Nouvelle méthode simplifiée de kératoplastie transfixiante
 chez le lapin.
 Annales omlist (Paris) 202, 209-217, 1969.
36. - SCAPPEY (T.). -
 Cryopreservation of human corneas from penetrating kera-
 toplasty.
 In Polack F. M. : "Corneal and external diseases of the
 eye".
 Charles C. Thomas Publ. Springfield 359-362, 1970
37. - SUGAR (A.), BENSON (W.), BURDE (R. M.), WALTMAN
 (S. A.). -
 Alternate-day versus daily systemic cortico-steroids in
 corneal homograft refection.
 Amer. J. ophthal. 75 : 3 , 486-489.
38. - TAILLEBOURG (O.), PAYRAU (P.), POULIQUEN (Y.),
 FAURE (J. P.). -
 A histological and electron microscopical study of cryo-
 preserved corneal endothélium before and after homografting
 Ophthal. Res. 5 : 342-352, 1973.

39. - TRAGAKIS (M. P.), BROWN (J. I.), -

The significance of anterior synechiae after corneal transplantation.

Amer. J. Ophthalm. 74 : 3, 532-533, 1972.

40. - WEEKERS (J. F.), POULIQUEN (Y.), -

Mesure de l'épaisseur de la cornée. Etude de patients opérés de greffe perforante.

Arch. ophtal, 32 : 2 , 137-142, 1972.

41. - ZAJACK (M.), -

Pachometrische untersuchungen nach keratoplastik.

Klin. MBL. Angenheilk 161 : 5, 569-572, 1972.
